平成２１年度戦略的基盤技術高度化支援事業

「米糠を利用した免疫賦活発酵食品素材の開発」

研究開発成果等報告書

平成２２年３月

委託者　四国経済産業局

委託先　財団法人かがわ産業支援財団

目　次

第１章　研究開発の概要

１－１　研究開発の背景・研究目的及び目標

（1） 背　景

日本は、伝統的に優れた発酵技術を有しており、味噌、しょうゆ、清酒、納豆や抗生物質など、薬から食品、調味料まで多種多様な発酵生産物が流通している。

ところで、発酵とは、微生物の力を借りて、食品を別種の有用食品へ変換することとされるが、近年、発酵産物そのもののほか、発酵に係る微生物の健康維持や抗老化への効果についても、認識されるようになった。例えば、ヨーグルトを作る乳酸菌のプロバイオティクス効果や納豆を作る納豆菌の血圧降下効果、またこうじ成分の美白効果なども研究されている。

このような動向から、発酵微生物自体も含有する発酵産物そのものを機能性食品やサプリメント、化粧品に配合する例も増えつつある。ただし、有用微生物として着目されているのは、おもに、乳酸菌、酵母、納豆菌であり、我々が本事業で利用するグラム陰性菌を利用した発酵産物は、申請者である自然免疫応用技研（株）が先行して開発した例を除き、事業化されておらず、新規性が高い。

本事業で開発される高付加価値化発酵食品素材は、飼料、食品、化粧品製品へ、機能性素材として配合される。飼料市場は、抗生物質を使わずに感染を抑制できる飼料、すなわち動物の免疫活性をあげる効果を持つ飼料が望まれており、糖脂質はまさしくこのニーズにマッチする。機能性食品市場は、近年メタボリックシンドロームが増加している背景から、市場が成熟化し競争は激しく、メーカーは機能性とともに新規性・独創性を併せ持つ素材を探している。

糖脂質素材は、これまで機能が認識されていなかった新規素材であることから、メーカーのニーズにも答えられる。化粧品市場においても、消費者は機能性を重視するようになっているが、その中でも、アレルギー、乾燥肌に対する機能の要望は高い。糖脂質のように、自然免疫系に働きかける素材は、アレルギー抑制効果があることから需要が見込まれる。

このように、本事業で開発される製品は、幅広い市場ニーズを有する。

（2）研究目的

食品は、安全性はもとより、風味、消化性、栄養改善などの面で、多様化する消費者ニーズに答えていく必要があり、さらに発酵食品の枠を超えて、血圧降下作用や整腸作用など、新たな機能を付与した高付加価値化が求められるようになった。

とりわけ発酵食品に求められる多様なニーズに対応するために、従来の方法で発酵原料を変える、従来の発酵微生物の発酵力を改変するなどがあるが、発想の転換をはかり、微生物自体が持つ有用成分も多様性の因子として着眼することが必要であり、昨今では、酵母や乳酸菌そのものが、健康に良い働きをすることが明らかとなっている。

本研究開発では、さらに新たな視点として、経口・経皮で免疫系を活性化する糖脂質を持つ安全なグラム陰性細菌を利用した発酵食品あるいは発酵食品素材の開発を目的とする。

（3） 目　標

発酵食品は、安全性、風味、消化性、栄養改善のほか、多様な高付加価値化が求められている。そこで従来にない視点として発酵産物中の微生物成分の作用に着目し、免疫活性化能の高い糖脂質を持つ安全なグラム陰性細菌を利用した米糠発酵抽出物の開発を目標とする。

具体的には、スクリーニングしたグラム陰性細菌と米糠を組み合わせた米糠発酵抽出物の製品化をめざし、製造法および品質管理技術を確立する。

このうち、本事業での具体的目標は、下記の通りである。

①食用植物から免疫活性化に特長のある糖脂質を持つグラム陰性細菌をスクリーニングする。

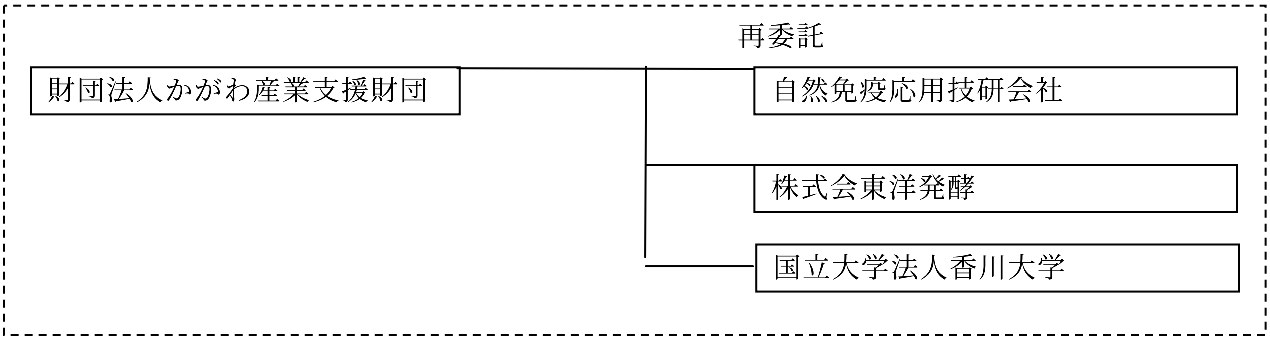
②①でスクリーニングしたグラム陰性細菌より１種選び、農産廃棄物である米糠を発酵基質として、免疫活性化能を持つ高付加価値化発酵食品素材（以下、「米糠発酵抽出物」という。）の製造法を確立する。

③米糠発酵抽出物中の有効成分である糖脂質を、特異的に測定する品質管理技術を確立する。これにより、川中の発酵企業に製品の高付加価値化と多様化の道を開き、川下のヘルス産業メーカーに発酵素材を使った高付加価値商品を提供することが可能となる。

１－２　研究体制

（１）研究組織

１）研究組織（全体）

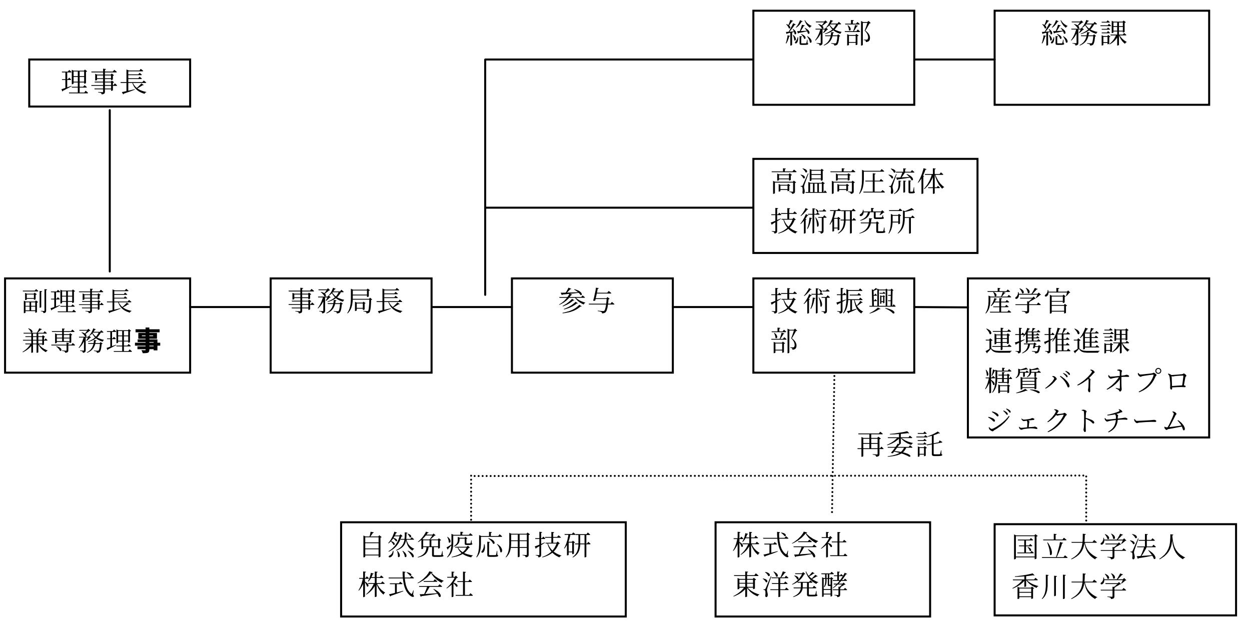


総括研究代表者（ＰＬ）
自然免疫応用技研株式会社
代表取締役　河内　千恵

副総括研究代表者（ＳＬ）
株式会社東洋発酵
取締役 技術本部　本部長　長島　直

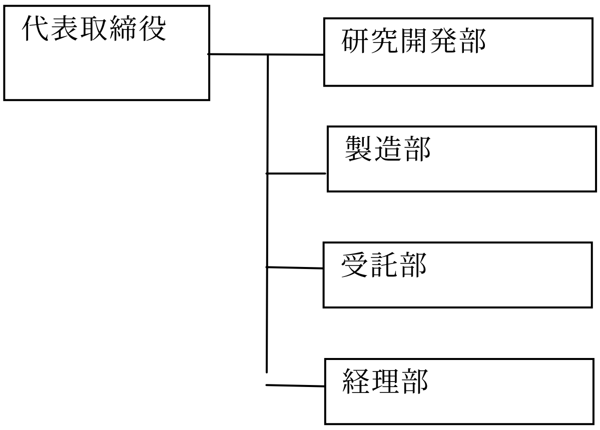
２）管理体制

①事業管理者（財団法人かがわ産業支援財団）

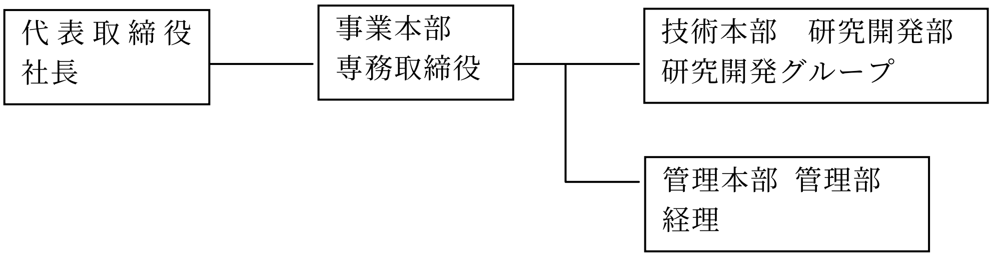


②（再委託先）

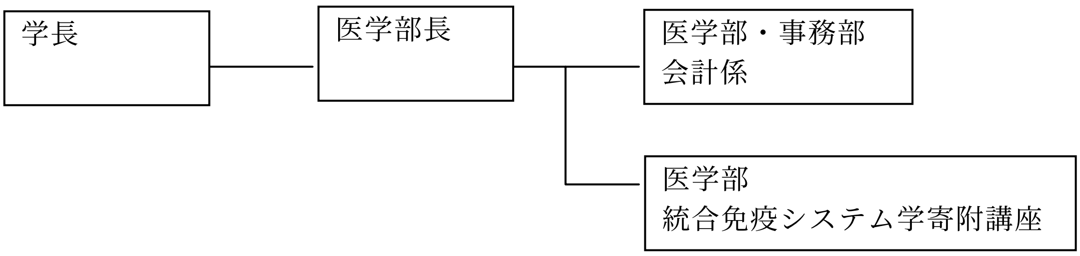
自然免疫応用技研株式会社



株式会社東洋発酵



国立大学法人香川大学



（2）　管理員及び研究員

【事業管理者】　財団法人かがわ産業支援財団

①管理員

氏　　　名	所属・役職	実施内容（番号）
佐伯　吉朗	参与	管理業務
三浦伊知朗	技術振興部長	
黒川　俊秀	産学官連携推進課長	
稲津　忠雄	糖質バイオプロジェクトチーム主幹	
鵜川　康彦	産学官連携推進課課長代理	

【再委託先】<u>※研究員のみ</u>

自然免疫応用技研株式会社

氏　　　名	所属・役職	実施内容（番号）
河内　千恵 中田　陽子 西澤　孝志 新田　久美子 筒井　翔子	代表取締役 研究開発部・研究員 製造部・部長 製造部・研究員 受託部・研究員	③-2 ③-2 ③-1 ①-1 ①-2

株式会社東洋発酵

氏　　　名	所属・役職	実施内容（番号）
長島　直 村上　雅紀	取締役、技術本部　本部長 技術本部 研究開発部 研究開発グループ 研究員	②-1 ②-2

国立大学法人香川大学

氏　　　名	所属・役職	実施内容（番号）
杣　源一郎	医学部統合免疫システム学寄附講座・客員教授	①-3

（３）　経理担当者及び業務管理者の所属、氏名

（事業管理者）

財団法人かがわ産業支援財団

（経理担当者）　事務局長兼総務部長　　　白井　幹二

（業務管理者）　技術振興部長　　　　　　三浦　伊知朗

（再委託先）

自然免疫応用技研株式会社

（経理担当者）　経理部　吉田　彩

（業務管理者）　代表取締役　河内　千恵

株式会社東洋発酵

（経理担当者）　管理本部管理部経理　岩切　佳子

（業務管理者）　専務取締役　高田　敦士

国立大学法人香川大学

（経理担当者）　医学部事務部長　前川　正

（業務管理者）　医学部統合免疫システム学寄附講座　客員教授　杣　源一郎

（４）他からの指導・協力者名及び指導・協力事項

研究開発推進委員会委員

氏　　　名	所属・役職	備 考
河内　千恵	自然免疫応用技研株式会社・代表取締役	ＰＬ
中田　陽子	自然免疫応用技研株式会社・研究開発部研究員	
西澤　孝志	自然免疫応用技研株式会社・製造部部長	
新田　久美子	自然免疫応用技研株式会社・製造部研究員	
筒井　翔子	自然免疫応用技研株式会社・受託部研究員	
長島　直	株式会社東洋発酵・取締役、技術本部　本部長	ＳＬ
村上　雅紀	株式会社東洋発酵・技術本部 研究開発部 研究開発グループ研究員	
杣　源一郎	国立大学法人香川大学・医学部統合免疫システム学寄附講座客員教授	

１－３　成果概要

（１）米糠発酵抽出物用の微生物の選択

安全で有用な機能性糖脂質を得るため、食用植物あるいは発酵産物（蕎麦、ホワイトソルガム、稲、藍すくも、自然薯、およびその栽培土壌）からグラム陰性細菌を 91 種スクリーニングしライブラリー化した。うち 28 株について同定を行なった。同定した菌のうち、米糠発酵に適する菌として稲の根由来のグラム陰性細菌 X 株を選択した。この X 株の糖脂質（IP-X）を精製し、その生物活性と構造解析を行なった。IP-X は、既存の糖脂質である IP-PA1 に比較して分子量が小さいことがわかった。また単位重量あたりの、マクロファージ活性化能は既存の糖脂質である IP-PA1 の 3 倍であった。構造的には、Lipid A 部分、O 抗原多糖部分とも IP-PA1 と異なることが明らかとなった。また構成糖分析により、IP-X では、グルコース、ラムノース、マンノース、ガラクトースを含有することがわかった。

（２）米糠発酵抽出物の製造法の確立

上記で選択した菌株による糖脂質の生産条件を最適化するために、フラスコによる生産条件検討を行った。検討項目は通気、糖脂質抽出、培地としての米糠の添加、前培養液の移植などである。これらの条件を基に５L ジャーファーメンター、３０L ジャーファーメンターによる糖脂質の検討を行った。その結果、200μg/ml の糖脂質を得ることができた。さらに濃縮することにより 1mg/mg solid の糖脂質粉末を得ることができた。

（３）米糠発酵抽出物の品質管理技術の確立

米糠発酵抽出物中の有効成分となる IP-X を特異的に測定する ELISA 法の確立をめざし、今年度は、ELISA 法に必要な IP-X の糖鎖に結合する可能性を持つモノクローナル抗体の取得を試みた。マウスに IP-X を免疫した上で、脾臓を摘出し、当該抗体を産生するハイブリドーマを 5 種スクリーニングした。

１－４　当該研究開発の連絡窓口

財団法人かがわ産業支援財団　技術振興部　産学官連携推進課
〒761-0301　香川県高松市林町 2217 番地 16
電話 087-840-0338　　FAX087-864-6303

第2章　本　論

2－1　米糠発酵抽出物用の微生物の選択

２１年度は、食用植物から免疫活性化に特長のある糖脂質を持つグラム陰性細菌をスクリーニングした。

2―1―①　食用植物からの有用糖脂質を有するグラム陰性細菌のスクリーニング

⑴研究目的⑵
安全性の観点より、食用植物である稲、蕎麦、ホワイトソルガム等から、これらに付着するグラム陰性細菌を、少なくとも 20 種スクリーニングし、ライブラリー化する。

⑴研究内容⑵
蕎麦栽培土壌、蕎麦粉、ホワイトソルガム、藍すくも、自然薯、自然薯栽培土壌の水抽出物を細菌培養用の固形培地に散布し、出現するコロニーを各種試験で検査し、グラム陰性細菌を単離する。

⑴研究成果⑵
（１）材料と方法
①試料
＜蕎麦土壌＞
※株式会社谷食糧より提供されたものを用いた。
A．祖谷１
B．祖谷２
C．徳島三好１
D．徳島三好２
E．北海道・幌加内１
F．北海道・幌加内２

＜蕎麦粉＞
※株式会社谷食糧より提供されたものを用いた。
A．内層粉
B．中層粉
C．外層粉
D．皮
E．実

＜ホワイトソルガム粉末＞
※中野産業㈱よりに提供されたものを用いた。
A．粉末
B．全粒粉末
C．内皮粉末
D．外皮・内皮粉末
E．外皮粉末

<藍すくも>
※新居製藍所より供与されたものを用いた。
A．藍すくも 1（発酵 4 日目）
B．藍すくも 2（発酵 27 日目）

<自然薯および自然薯栽培土壌>
※つやま新産業創出機構より供与されたものを用いた。
A．自然薯１（草刈号）
B．自然薯２（山口政田農園）
C．土壌

<稲>
稲の根

②試薬
・標準寒天培地「ニッスイ」（日水製薬）
・TSI 寒天培地「ニッスイ」（日水製薬）
TSI 寒天培地は TSI 寒天培地粉末 15.35g を精製水 250ml に加温溶解し、121℃で 15 分間高圧蒸気滅菌後、滅菌済試験管に 8ml ずつ分注し半斜面に凝固させて調製した。
・3%水酸化カリウム
・チトクローム・オキシダーゼ試験用ろ紙（日水製薬）
・ID テスト・EB20「ニッスイ」（日水製薬）
・注射用水（大塚製薬工場）
・注射用生理食塩水（大塚製薬工場）

③器具および装置
・シリンジ
・チップ
・マイクロプレート
・滅菌シャーレ：90×15mm（IWAKI）
・アルミ箔
・マイクロプレートリーダー：Model680（BIO-RAD）
（ソフトウエア：マイクロプレートマネジャーversion 5.2.1)
・恒温槽： SLI-220（EYELA）
・インキュベーター：MIR-162（SANYO）
・プレートミキサー： MPM-1（IWAKI）
・マイクロピペット： ピペットマン（ギルソン）
・超音波洗浄器： UT-305HS（SHARP）
・マイクロ遠心機：TX-160（TOMY）

④サンプルからの微生物の分離
サンプルをそれぞれ 1g 秤量し、個体状のサンプルは、滅菌薬匙を用いて破砕した上で、滅菌生理食塩水を加えて 10ml とした。ボルテックスミキサーにて 30sec×10 回攪拌し得られた懸濁液から、4 倍、16 倍、64 倍などに滅菌生理食塩水でさらに希釈した液を調製した。懸濁液の原液および各希釈液 100μl ずつを標準寒天培地の平板プレートに塗抹し、37℃の恒温槽内で 2 日間分離培養を行った。各希釈段階について 2 枚ずつ塗抹した。

⑤Ryu の方法によるグラム陰性菌/グラム陽性菌の判定

各菌株の純培養で得られた菌のコロニーを被検菌とした。プレート上のコロニーより、菌体を掻き取りスライドグラス上に移し、3%KOH 水溶液 5μl を菌体にかけ、菌体をかき混ぜた。1 分以内に、溶菌して糸を引く場合はグラム陰性菌とし、菌体をかき混ぜて変化が認められず、溶菌しない場合は、グラム陽性菌とした。グラム陰性と判定した各菌株について、菌を 10%グリセロール含有 LB 培地に懸濁して-80℃にて凍結保存した。

⑥ブドウ糖発酵性試験（TSI 寒天培地による培養）

TSI 寒天培地は腸内細菌の確認培地として、ブドウ糖、乳糖、白糖の分解能、ガス産生能、硫化水素産生能を同時に観察できる培地であり、今回の試験では、ブドウ糖発酵性の有無に主眼をおいて試験した。Ryu の方法により、グラム陰性菌と判定した菌株より代表的なものを選択し被検菌とした。被検菌を TSI 寒天培地の高層部に穿刺、斜面に塗布し、37℃の恒温槽にて 18～24 時間培養した。ブドウ糖発酵性の菌は高層部が黄色に変化し、ブドウ糖非発酵性の菌は高層部の色は朱色で変化しない。ブドウ糖のみを分解する菌は高層部が黄変し、斜面部は無変化。乳糖、白糖ともに、またはいずれか一方の分解菌は高層、斜面部ともに黄変。ガス産生があれば高層部に気泡または亀裂を生じる。硫化水素の産生があれば高層部が黒く変化する。

⑦チトクロームオキシダーゼ試験

チトクローム・オキシダーゼ試験用ろ紙 1 片をシャーレに入れ、精製水数滴を滴下してろ紙全体を湿らせ、直ちにその上に固形培地上の培養菌を塗布した。1 分以内に塗布部が深青色を呈する菌をチトクローム・オキシダーゼ陽性菌と判定した。塗布部分に変化が認められない場合はその菌をチトクローム・オキシダーゼ陰性菌と判定した。

⑧ID テスト

ID テスト・EB20 は、微量テスト法と数値同定法の理論に基づいて開発されたもので、オキシダーゼ試験の成績と 20 項目の生化学的性状および運動性のパターンにより、ブドウ糖発酵性グラム陰性桿菌を同定することができる。

Ryu の反応と TSI 寒天培地での培養から、ブドウ糖発酵性のグラム陰性菌と判定された菌株を対象として EB20 を用いた ID テストを試みた。試験操作は ID テスト・EB20「ニッスイ」(code 06626、日水製薬株式会社）に添付の取扱説明書に従って行った。37℃24 時間培養後、生化学的性状の成績を判定した。判定結果に基づいて ID テスト・EB20・解析プロファイル(5 版)により、対応する菌種を検索した。

（２）結果

①各サンプルで得られた細菌のまとめ

試料	種類	菌数（個/g）	ｸﾞﾗﾑ陰性細菌数/調べたｺﾛﾆｰの数	ｽﾄｯｸ数	ｽﾄｯｸ数合計	同定数
蕎麦土壌	Ａ．祖谷１	4.7×10^{6}	0/5	0	13	0
	Ｂ．祖谷２	4.6×10^{6}	1/4	1		1
	Ｃ．三好１	3.9×10^{6}	2/5	2		2
	Ｄ．三好２	9.2×10^{6}	0/2	0		0
	Ｅ．幌加内１	5.6×10^{6}	2/8	2		1
	Ｆ．幌加内２	2.9×10^{6}	8/21	8		1
蕎麦	Ａ．内層粉	5.1×10^{4}	5/6	5	27	4
	Ｂ．中層粉	1.7×10^{5}	5/9	5		4
	Ｃ．外層粉	9.7×10^{5}	4/4	4		2
	Ｄ．そば殻	1.2×10^{6}	5/5	5		4
	Ｅ．そば実	1.8×10^{5}	8/13	8		4
ホワイトソルガム	Ａ．粉末	1.4×10^{5}	10/12	10	44	2
	Ｂ．全粒粉末	2.9×10^{5}	5/5	5		2
	Ｃ．内皮粉末	3.3×10^{4}	6/6	6		1
	Ｄ．外皮・内皮粉末	1.9×10^{6}	12/14	12		2
	Ｅ．外皮粉末	3.3×10^{6}	11/12	11		3
藍すくも	Ａ．すくも１	1.8×10^{8}	0/6	0	1	0
	Ｂ．すくも２	2.5×10^{7}	1/19	1		1
自然薯	Ａ．土壌	3.4×10^{6}	1/11	1	5	1
	Ｂ．山口政田農場	3.9×10^{5}	2/19	2		2
	Ｃ．草刈号	9.2×10^{6}	2/20	2		2
稲の根		10^{7} レベル	15/18	1	1	1

（３）まとめ

各サンプルから全部で 91 株のグラム陰性細菌を単離した（蕎麦土壌より 13 株、蕎麦粉より 27 株、ホワイトソルガムより 44 株、藍すくもより 1 株、自然薯土壌から 1 株、自然薯から 4 株、および稲の根より 1 株)。尚このうち、ブドウ糖発酵性およびチトクロームオキシダーゼの有無と ID テストにより 28 株について同定を行なった。

2－1－②　糖脂質の分析と米糠発酵抽出物用のグラム陰性細菌の選択
⑽研究目的⑾
免疫活性化能が高く、低分子の糖脂質を有するグラム陰性細菌を 1 種選択する。

⑽研究内容⑾
２－１－①でスクリーニングしたグラム陰性細菌の中より、米糠発酵抽出物製造に適した菌を選択肢、その糖脂質を粗抽出し、免疫活性化能をマクロファージからの NO 酸性誘導能で、また分子量を HPLC 等にて分析する。

⑽研究成果⑾
（１）材料と方法
①細胞
・グラム陰性細菌 X 株
・マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 は ATCC(No.TIB-71) より購入した。

②試薬
・IP-PA1：*Pantoea agglomerans* より精製した高純度標品を用いた。
・電気泳動マーカー：Prestained Protein Marker, Broad Range（Premixed Format）（Cat　No 7708L、NEW ENGLAND BioLabs）を用いた。
・銀染色：シルベストステイン（Cat.No:30642-41、ナカライテスク）キットにより行った。

③X 株の培養
X 株のコロニーの一部を掻き取り普通寒天培地に播き、30℃の恒温そう内で一晩培養した。コロニー一つを滅菌済み LB 培地 1 リットルの入った 3L 容の坂口フラスコに入れ、30℃にて一晩振盪培養した。培養後、遠心チューブに培養液を移し、7000rpm で遠心分離(HITACHI SCR-20B)を行い、X 株の湿菌体を回収した。

④X 株の湿菌体からの糖脂質の精製
X 株の湿菌体からの糖脂質（IP-X）の精製は Westphal らの方法に従って行った。すなわち、湿菌体 5.4g に蒸留水を加えて 54ml(湿菌体 100mg/ml)とした。菌を懸濁してこの液に同容量の 90%フェノールを加え、65℃から 70℃で 10 分間攪拌した。その後、4℃まで液を冷却し、10000rpm で遠心分離を行った。上層の水層を別の容器に回収し、残りのフェノール層と中間層に、回収した水層と同量の蒸留水を加え、再度 65℃から 70℃で 10 分間攪拌し糖脂質を再抽出した。その後、4℃まで液を冷却し、遠心分離を行った。2 回目の水層を一回目の水層と合わせ蒸留水で透析し、分光光度計で透析外液の 320nm から 210nm の間での吸収を測定し 270nm 付近のフェノールの吸収が認められなくなった時点で透析は終了とした。この透析内液を X 株の粗糖脂質抽出液とした。透析内液をさらに DNA 分解酵素（DNase I）(50U/ml)及び RNA 分解酵素（RNase A）(20μg/ml)処理し、タンパク質分解酵素（プロティナーゼ K）(100μg/ml)処理後、フェノール抽出を行い、その後、水層を透析した。蒸留水で透析し、分光光度計で透析外液の 320nm から 210nm の間での吸収を測定し 270nm 付近のフェノールの吸収が認められなくなった時点で透析は終了とした。透析終了後、透析内液を回収し、マイクロコン YM-100（ミリポア）を用いて限外濾過により濃縮した。本濃縮液を X の精製糖脂質溶液（IP-X 溶液）とした。

⑤タンパク質定量
BCA Protein assay kit（PIERCE）を用いて BCA 法により、kit に含まれる牛血清アルブミンを標準品として使用して精製 IP-X に含有されるタンパク質質量を測定した。

⑥糖定量
グルコースを標準品としてフェノール硫酸法により中性糖の定量を行った。

⑦核酸含量の測定
核酸含量は 260nm の吸光度値より 320nm の吸光度値を差し引いた値に 1.0 OD 当たり 50μg/ml を乗じて DNA 量として算出した。

⑧糖脂質量測定（Limulus assay）
糖脂質に特異的に反応する Limulus assay キットとして生化学工業のエンドスペシーを用いた。標準糖脂質は生化学工業の糖脂質標準品を用いた。測定された Limulus 活性値より、IP-PA1 としての換算値を算出した。

⑨β-グルカン含量の測定
β-グルカンの含量について生化学工業のファンギテック G テスト MK を用いて測定した。 β-グルカンの標準品として、ファンギテック G テスト MK（生化学工業）を用いた。測定はキット添付の説明書に従って行った。

⑩SDS-PAGE
トリシンを用いたドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル(ポリアクリルアミドの濃度 15%）電気泳動（Tricine-SDS-PAGE）により、精製糖脂質を分画した。糖脂質は 5μg/lane で泳動した。

⑪HPLC 分析

・機器	ポンプ：DGU-20A3 （島津)、LC-20AB（島津）
	検出器：SPD-20AV（島津）
	カラムオーブン：CTO-20AC（島津）
・カラム	TSK gel G3000SW （φ7.5×300mm、東ソー株式会社）
・ソフトウェア	LC Solution（島津）
・条件	サンプル：1.0mg/ml に調整し、20μl をインジェクションした
	溶出：100mM 酢酸-アンモニア緩衝液（pH 5.0）
	流速：1.0ml/min
	検出：210nm
	温度：25℃

⑫IP-X の免疫賦活作用の測定
マウスのマクロファージ系の培養細胞株である RAW264.7 に、糖脂質を添加した後の、細胞からの一酸化窒素(NO)産生を NO 代謝物の亜硝酸の培養液中の濃度を指標として測定した。RAW264.7 細胞は培養フラスコからピペッティングにより回収し、培養液(10%FCS 含有、カナマイシン 50μg/ml、アンピシリン 60μg/ml 含有 RPMI1640 培地)により細胞濃度を 8×105 個/ml に調整した。細胞懸濁液 100μl(8×10^4 個/100μl)を 96 穴平底プレートの各穴に移し、細胞がほぼ付着する 6 時間後に試験に用いた。20 時間 37℃、5%炭酸ガス培養器内で培養し、培養終了後、上清 50μl を別の 96 穴プレートに回収した。常法に従い Griess 試薬を用いて培養液中の一酸化窒素の代謝物である亜硝酸量を測定した。

（2）結果
①グラム陰性細菌 X 株からの糖脂質の精製
今回スクリーニングした株をさらに菌の生育性、扱いやすさ等の視点で 5 株を選抜した。選択した株を、米糠を含む培地で培養し、糖脂質の生産性を検討した。評価は糖脂質活性を測定することで行った。その結果、稲から単離したパントエア属の X 株が高い活性を示したので、X 株で以後の実験を進めることとした。

X 株の LB 培地 1 リットルでの培養により､湿菌体 5.4g を回収できた｡回収した 5.4g を用いて､糖脂質の精製を行った｡フェノール抽出により､5.4g の湿菌体から crude(粗精製)の IP-X は､290mg(Limulus 活性の測定から)得られた｡抽出された核酸は､DNA として 60mg であった(表 1)｡粗精製 IP-X 標品の主な夾雑物である核酸含量を減らし､糖脂質の純度を高める目的でさらに精製を行い､精製 IP-X を得た(表 1)｡得られた､精製 IP-X は､Limulus 活性で 120mg であり､粗精製 IP-X 標品からの回収率は約 40%であった｡DNA は､0.6mg となり､粗精製 IP-X の 1/100 となった｡精製 IP-X の凍結乾燥重量は 42mg と測定された(表 1)｡X 株から得られた糖脂質は､Limulus 活性による IP-PA1 としての換算値が 120mg に対して､乾燥重量が 42mg であったので､単位重量当たりの Limulus 活性の IP-PA1 を基準にした場合の比活性は 2.85(120/42)となり IP-PA1 より約 3 倍高いことが示された。

精製IP-Xの糖質､核酸およびタンパク質についてのそれぞれの測定結果を表2に示した｡グルコースを標準品としてフェノール硫酸法により糖定量を行い、中性糖の含量を求めたところ 54.6%であった｡BCA 法により牛血清アルブミンを標準品として用いてタンパク質定量を行ったところ 6.1%であった｡核酸含量は 260nm の吸光度値より 320nm の吸光度値を差し引いた値に 1.0 OD 当たり 50μg/ml を乗じて DNA 量として算出したところ､最大 1.3%であった｡IP-X では β-グルカンは無視できる程度の含量であることがわかった。

表１．X 湿菌体から回収された IP-X

糖脂質標品	Limulus (mg)	DNA (mg)	Weight (mg)
粗精製 IP-X	290	60	NT
精製 IP-X	120	0.6	42

NT：not tested

表２．IP-X 精製糖脂質と IP-PA1 の比較

項目	IP-X	IP-PA1
糖含量	54%	67.6%
タンパク質含量	6.1%	<0.5%
核酸含量	1.3%	<0.5%
β-glucan	1.7ng/mg	NT
Limulus 活性/乾燥重量	2.91mg/mg	1mg/mg
分子量	main: 5kDa minor: 10～12kDa、25kDa～40kDa	main: 5kDa minor: 30kDa～60kda

NT：not tested

②IP-X の分子量の測定

トリシンを用いたドデシル硫酸ナトリウムーポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を行い､泳動後､銀染色を行った（図１）。IP-X は 4kDa～6kDa と約１万と約 25kDa～40kDa にバンドが認められた｡低分子域糖脂質の分子量は、IP-PA1 と同程度であり、高分子域糖脂質の分子量は、IP-PA1 より小さいことがわかった｡また、HPLC によるゲルろ過分析の結果では、ミセル状態の分子量が予想できるが、大腸菌糖脂質（LPSe)、IP-PA1、IP-X ともに、同程度のミセル分子を形成していることがわかった（図２)。HPLC の条件検討により、さらに感度を上げた測定が望ましい。

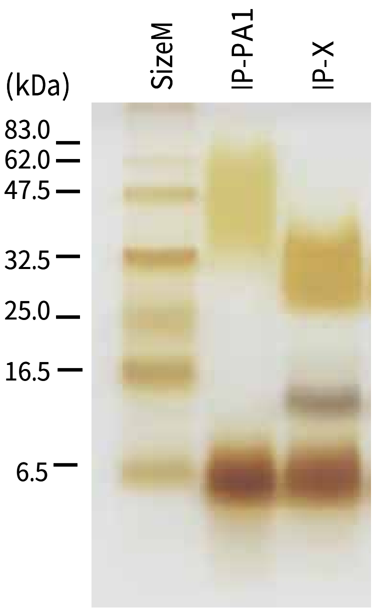


図１．SDS-PAGE による IP-PX の分子量の測定

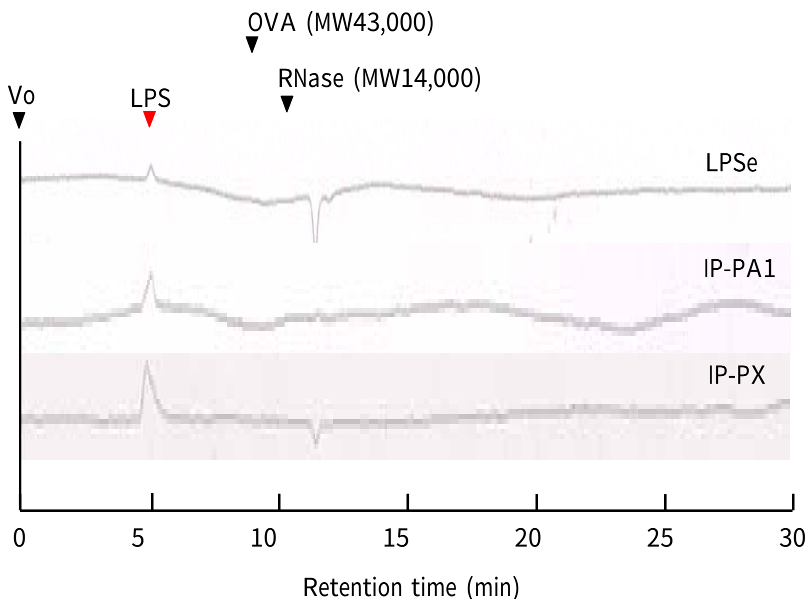


図２．HPLC による IP-PA1 と IP-X のｹﾞﾙろ過

（３）まとめ

前項でスクリーニングしたグラム陰性細菌を㈱東洋発酵に提供した。東洋発酵側で菌の生育性、扱いやすさ等の視点で 5 株を選抜し、さらにそれらを米糠を含む培地で培養し、得られた糖脂質の生産性を測定することによって検討した。その結果、稲から単離した X 株が高い活性を示したため、米糠発酵抽出物には X 株を利用することとした。

X 株より、標準的な糖脂質の抽出・精製方法により、純度 90%以上の精製糖脂質（IP-X）を得ることができた。IP-PA1 の収量は、粗抽出の段階で湿菌体 5.4g 当たり、Limulus 活性として 290mg が得られた。この値より、精製 IP-X の凍結乾燥重量と Limulus 活性からの換算重量の比率である、2.85 を用いて粗抽出された糖脂質の重量を算出すると、102mg（102/5.4= 18.9mg 糖脂質/g 湿菌体）となる。*Pantoea agglomerans* の場合、湿菌体 1g より、約 30mg の糖脂質が抽出されるのに対して、X 株では、湿菌体 1g 当たり、約 20mg と、IP-PA1 の場合の 2/3 程度の収量であることがわかった。

IP-X は、IP-PA1 に対して、約 1/3 の重量で同等の Limulus 活性を示すことから、IP-X の NO 誘導能を重量ベースで比較した場合には、約 3 倍 IP-PA1 に比較して NO 誘導能が高いことがわかった。

IP-X の分子量を SDS-PAGE および HPLS で分析した結果、IP-PA1 に比較して、分子量は小さいが、それらがミセル化した状態では、大きな差がないことが明らかとなった。

２－１－③ 新規糖脂質の構造解析

（研究目的）

選択したグラム陰性細菌の糖脂質（IP-X）構造を分析する。

（研究内容）

IP-X の糖脂質の中の Lipid A 構造をポリミキシン B との結合性で確認し、糖鎖構造を既存の糖脂質素材 IP-PA1 の糖鎖に特異的抗体との結合性、及び構成糖分析によって、解析する。

（研究成果）

（１）材料と方法

①細胞

・マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 は ATCC(No.TIB-71) より購入した。

②試薬

・IP-PA1：*Pantoea agglomerans* より精製した高純度標品を用いた。

・抗 IP-PA1 モノクローナル抗体：当該抗体を分泌するハイブリドーマの培養上清を用いた。

③IP-X の免疫賦活作用の測定

マウスのマクロファージ系の培養細胞株である RAW264.7 に、糖脂質を添加した後の、細胞からの一酸化窒素(NO)産生を NO 代謝物の亜硝酸の培養液中の濃度を指標として測定した。RAW264.7 細胞は培養フラスコからピペッティングにより回収し、培養液(10% FCS 含有、カナマイシン 50μg/ml、アンピシリン 60μg/ml 含有 RPMI1640 培地)により細胞濃度を 8×10^5個/ml に調整した。細胞懸濁液 100μl(8×10^4個/100μl)を 96 穴平底プレートの各穴に移し、細胞がほぼ付着する 6 時間後に試験に用いた。IP-X を IP-PA1 の糖脂質濃度に換算して 4000ng/ml になるように調整した。さらに 10 倍ずつ 5 段階の段階希釈を行った。各希釈液を培養液でさらに 2 倍希釈したものと、各希釈液を 40μg/ml のポリミキシン B 含有培養液でさらに 2 倍希釈したものをそれぞれ調製し、細胞の入ったウェルへの添加用標品とした。同時に、IP-PA1 も試験した。各標品を予め細胞を添加してある 96 穴平底プレートの各穴に 100μl ずつ添加した。20 時間 37℃、5%炭酸ガス培養器内で培養し、培養終了後、上清 50μl を別の 96 穴プレートに回収した。常法に従い Griess 試薬を用いて培養液中の一酸化窒素の代謝物である亜硝酸量を測定した。

④精製 IP-X の、抗 IP-PA1 モノクローナル抗体に対する交差反応性の検討

IP-PA1 と IP-X の類似性を調べるため、抗 IP-PA1 モノクローナル抗体 6 種に対する交差性を調べた。96 穴イムノプレートに crude IP-X、IP-PA1 および大腸菌 O128 糖脂質(糖脂質 e)の 3 種の糖脂質を 10μg/ml の濃度で 0.05ml/well で入れ、4℃で一晩放置した。その後、ﾘﾝ酸緩衝生理食塩水(PBS)(pH7.3～7.7、日水製薬製)に 0.05%ポリオキシエチレン（２０）ソルビタンモノラウレート(和光純薬工業製、Tween20 相当品)を添加した溶液(PBS-T)で 3 回洗浄した後、3%牛血清アルブミン(BSA)を入れ、室温で 1 時間放置し、抗体その他のタンパク質の非特異的吸着を防止した。その後、PBS-T で 3 回洗浄後、ｳｴﾙに、6 種の IP-PA1 に特異的に反応するモノクローナル抗体を含有するハイブリドーマ培養上清液 0.05ml を入れ、室温で 1 時間放置した。次いで、各ｳｴﾙを PBS-T で 5 回洗浄し、1%BSA で希釈したアルカリフォスファターゼ結合抗マウス IgG、M、A 免疫グロブリン抗体(Sigma 社製)を 0.05ml/ウエルに入れ、室温で 1 時間放置した。その後、PBS-T で 5 回洗浄し、1mg/ml になるように p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム(和光純薬工業製)を基質緩衝液に溶解した溶液を 0.1ml/ｳｴﾙ入れ、室温で 1 時間放置した後、2 規定の水酸化ナトリウム水溶液 0.05ml/ウエルを入れてプレートミキサーで混和して反応を停止させ、マイクロプレートリーダーにて 415nm の吸光度を測定した。

⑤糖鎖分析（外注）
＜IP-X の調整＞
IP-X 0.98mg に精製水 980μl を添加後、超音波処理（5min、37℃）にて溶解し、1mg/ml 濃度に調整した。

＜分析装置＞
HPLC システム：LC-20A システム（株式島津製作所）
検出器：分光蛍光光度計 RF-10AXL（株式島津製作所）

＜中性糖＞
カラム：TSK-gel Sugar AXG 4.6mmI.D.lx15cm（東ソー株式会社）
カラム温度：70℃
移動相：0.5mol/L ホウ酸カリウム緩衝液（pH8.7）
移動相流速：0.4mL/min
ポストカラム標識：反応試薬：1w/v%アルギニン・3 w/v%ホウ酸
反応試薬流速：0.5mL/min
反応温度：150℃
検出波長：Ex.320nm、Em.430nm

＜アミノ糖＞
カラム：TSK-gel Sugar SCX 6mmI.D.lx15cm（東ソー株式会社）
カラム温度：60℃
移動相：0.16mol/L ホウ酸ナトリウム緩衝液（pH7.6）
移動相流速：0.3mL/min
ポストカラム標識：反応試薬：1w/v%アルギニン・3 w/v%ホウ酸
反応試薬流速：0.5mL/min
反応温度：150℃
検出波長：Ex.320nm、Em.430nm

（２）結果
①ポリミキシン B を使った Lipid A に関する解析
IP-X のマクロファージ活性化作用をマウスのマクロファージ系培養細胞株である RAW264.7 細胞を用いて測定した。図１に測定結果を示した。IP-X は 1ng/ml（Limulus 活性）以上の濃度において RAW264.7 細胞から一酸化窒素を誘導することが示された。IP-X は、同時に測定した IP-PA1 とほぼ同等の用量依存的反応を示すことがわかった。

抗生物質のポリミキシン B は糖脂質の生物活性発現に重要である Lipid A 部分に親和性が高く、ポリミキシン B により糖脂質の生物活性が抑制されることがわかっている。そこで、IP-X と IP-PA1 をポリミキシンで前処理した上で上記と同様に RAW264 からの NO 産生誘導を調べた（図４）。IP-PA1 では、ポリミキシン B の前処理で NO 誘導能が約 1/1000 に低下しているのに対し、IP-X では、1/5 程度の低下であった。このことより、IP-X と IP-PA1 では、Lipid A との結合力が違う、すなわち Lipid A の構造が異なることが示唆された。

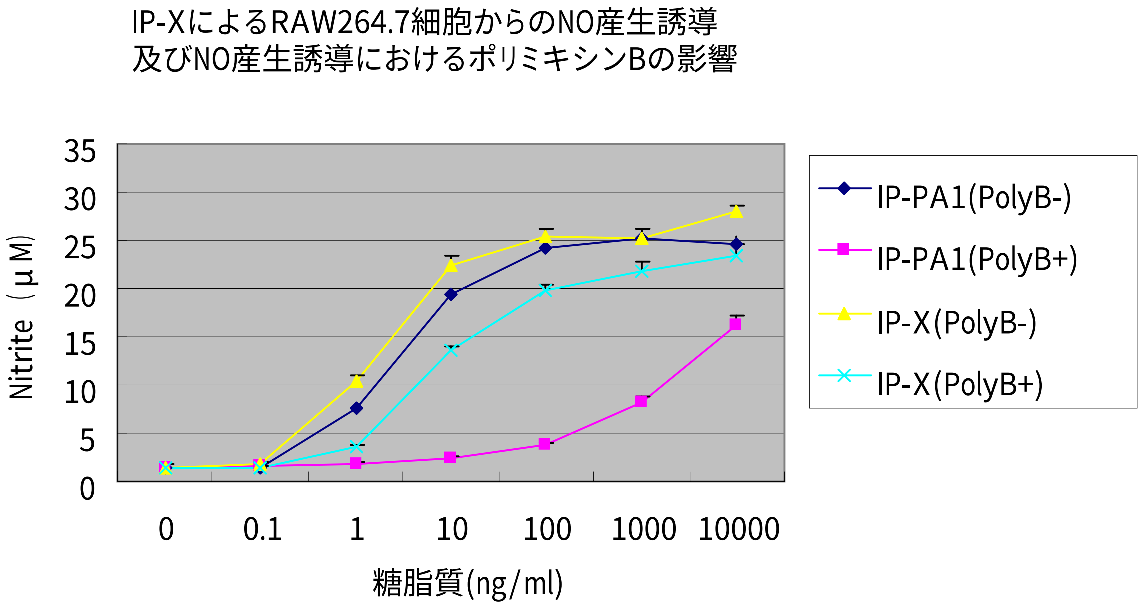


図４　RAW264.7 細胞からの NO 誘導能
各測定値は４例の平均±標準偏差で示した。IP-PA1 は重量濃度で示した。IP-X は Limulus 活性より求めた IP-PA1 としての換算重量で示した。

②IP-X の抗 IP-PA1 抗体に対する交差反応性の検討

粗精製 IP-X の抗 IP-PA1 モノクローナル抗体に対する交差反応性について間接 ELISA 法により測定した結果(表 1)、大腸菌糖脂質の場合と同様、6 種の抗 IP-PA1 モノクローナル抗体に対して交差反応性は認められなかった。従って、IP-X の糖鎖構造は、IP-PA1 の糖鎖構造とは異なることが明らかとなった。

表 1　IP-X の抗 IP-PA1 ﾓﾉｸﾛｰﾅﾙ抗体に対する交差反応性の検討

固相化糖脂質	培養液	4E11	34G2	20-A8	32-G3	49-F2	86-F12
PBS(-)	0.049	0.05	0.055	0.048	0.047	0.049	0.053
精製 IP-PA1	0.05	0.444	0.775	0.559	0.768	0.537	0.466
粗精製 IP-PA1	0.047	0.463	0.756	0.578	0.667	0.526	0.644
粗精製 IP-X	0.048	0.049	0.049	0.052	0.05	0.052	0.048
糖脂質 e	0.046	0.048	0.051	0.046	0.048	0.059	0.046

③糖鎖分析（外注）

IP-X を加水分解後の中性糖及びアミノ酸を、高速液体クロマトグラフ法にて分析した。IP-PX から検出された糖は、表 2 のとおりであった。

表 2

	単糖	試料中濃度（μg/mg）
中性糖	ラムノース	19.9
	リボース	29.1
	マンノース	8.01
	アラビノース	n.d.
	ガラクトース	3.09
	キシロース	n.d.
	ヘプトース	n.d.
	グルコース	43.6
アミノ糖	グルコサミン	37.4
	ガラクトサミン	0.990

n.d.：not detected（検出限界未満）

下線を付した数値：定量下限未満のため参考値

（3）まとめ

IP-PA1 による、RAW264.7 細胞からの NO 産生誘導は、糖脂質の Lipid A に結合するポリミキシン B により約 1/1000 に低下するのに対して、IP-X では、1/5 程度の低下が認められたのみであった。このことから、IP-X の Lipid A 構造は IP-PA1 と異なることがわかった。

IP-X は、IP-PA1 糖鎖特異的に反応する抗体に対して交差反応性は認められなかった。従って、糖鎖構造は、同じパントエア属であっても、IP-PA1 と同一ではないことが明らかとなった。

糖鎖分析の結果、IP-X の O 抗原多糖部分には、グルコース＞ラムノース＞マンノース＞ガラクトースが含まれることがわかった。アミノ糖は、コア多糖部分に含まれるものと予想される。IP-PA1 の O 抗原多糖部分はグルコースとラムノースであることから、類似性があると思われる、IP-PA1 に対する抗体と結合しないことから、全体の構造は異なると言える。

２－2　米糠発酵抽出物の製造法の確立

２１年度は、２－１－①でスクリーニングしたグラム陰性細菌より１種選び、農産廃棄物である米糠を発酵基質として、免疫活性化能を持つ高付加価値化発酵食品素材（以下、「米糠発酵抽出物」という。）のパイロットスケールでの製造法を確立した。

２－２－①　製造法の確立（ﾊﾟｲﾛｯﾄ試験）

（研究目的）

発酵技術を用いて、米糠を基質とし、①で選択したグラム陰性細菌を培養し、それに含まれる糖脂質をろ過機、濃縮機を用いて一定濃度含有する米糠発酵抽出物の製造を確立を目指した。

（研究内容）

スクリーニングした菌を使ってフラスコにて糖脂質生産の条件検討後、5L から 30L パイロットスケールでの米糠発酵抽出物の製造を行った。

（研究成果）

通気条件の検討：三角フラスコとバッフルフラスコを用いて発酵する際の通気及び物理的障害を検討した。米糠５％を添加した液体培地に X 株を移植し、37℃で 48 時間、振とう培養(120rpm)した。培養終了後 90℃で 20 分保温し有効成分を抽出した。その後遠心分離により上清を回収し、糖脂質量の測定に供した。三角フラスコを使用した方がバッフルフラスコを使用した時より糖脂質量は多かったまた、マイルドな振とう培養と静置培養で糖脂質生産を比較したところマイルドな振とう培養の方が良い結果だった。

糖脂質抽出条件の検討　　現在糖脂質の抽出は 90℃、20 分保温することで行っている。この検討を行った。5%米糠を含む培地で X 株を培養した後、超音波、121℃、105℃等で処理を行い糖脂質生産を測定した。結果、90℃、20 分の処理を行ったものがもっとも高い糖脂質活性を示した。

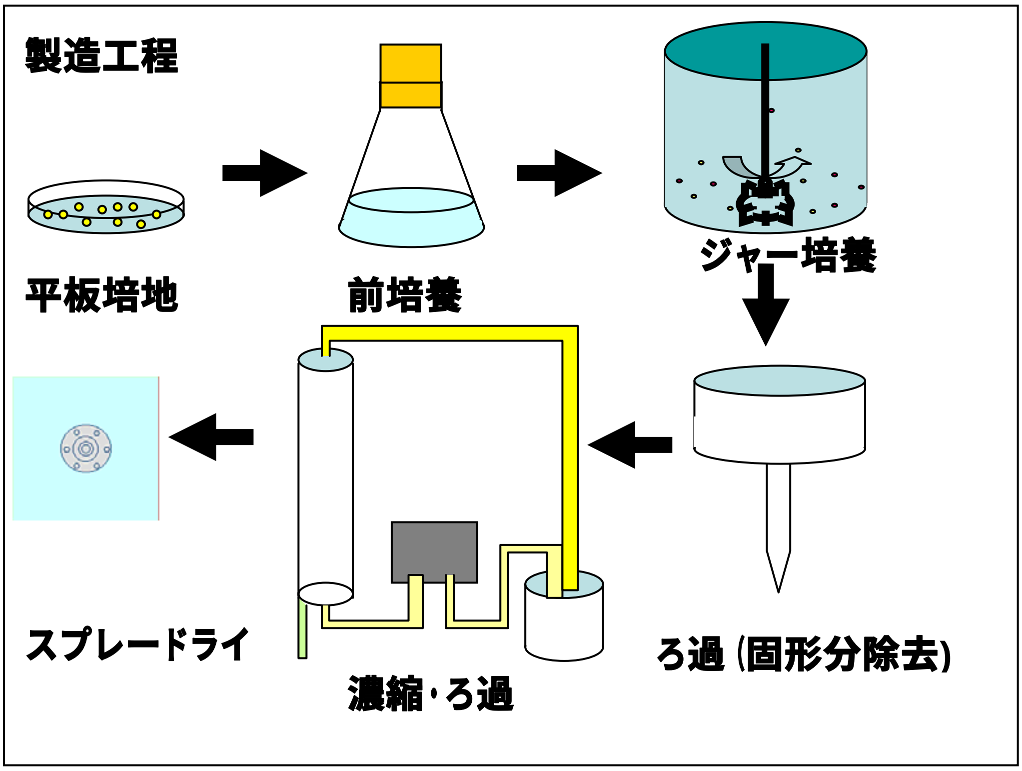
米糠の添加量：これまで米糠の添加量を５％で行ってきたが、この妥当性を検討した。X 株を LB 培地で前培養した後、米糠を 1～10%添加した培地に移植し培養させた。評価は定法に従った。結果、米糠を７％添加した時、最大の糖脂質量を示した。

前培養液の移植率：前培養液の米糠培地への移植量を検討した。X 株を LB 培地で前培養し、0.5～5%米糠培地に移植し 37℃で培養し、糖脂質の生産量を調べた。結果、前培養液を２％として移植した場合に糖脂質が最大生産量を示した。

米糠本培地への単糖の影響：X は籾殻に寄生している微生物である。籾殻はガラクタン、キシラン、アラビナン等のヘミセルロースで構成されている。つまりそれぞれの構成単糖を効率的に資化すると考えられた。そこで米糠培地に各単糖を添加して X 株を培養し、糖脂質生産性を検討した。結果、ガラクトースを添加した時、最大糖脂質生産量を示した。しかしその値は僅か 10%高いに留まった。ガラクトースは高価な糖であることよりコスト的な考えから実生産への使用は難しいと推測された。

5L ジャーファーメンターによる糖脂質生産：X 株を LB 培地で前培養した後、７％米糠を含む本培養培地に２％移植し、37℃で 24 時間マイルドに撹拌培養した。培養修了後 90℃30 分保温で糖脂質を抽出、ろ過し、凍結乾燥より少量の粉末を得た。糖脂質活性として 200μg/ml と高いものであった。

30L ジャーファーメンターによる糖脂質の生産：5L の時と同様に培養、抽出を行い、10L の糖脂質液を得た。これをろ過機、濃縮機により 1L まで濃縮し、スプレードライに供した。今後得られた粉末の糖脂質活性は 1mg/mg と高いものであった。今後安全性試験に供すると共に商品試作を行う。



2－2－② 規格決定

（研究目的）
30L パイロットスケールで得られる試作品を使い、糖脂質含量、菌数、金属イオン等のデータを取り、規格の決定を目的とした。

（研究内容）
確立した生産法で調整した糖脂質の品質規格を設定した。糖脂質の評価はモノクロナール抗体を使う ELISA 法で行う予定であったが、現在調製中のため、今回はリムルス法にて予備規格を決めた。

（研究成果）
X 株の糖脂質を抗原としてマウスに免疫し、前項記載の方法により抗体を調整した。ただし、抗体を用いた ELISA 法については、まだ確立されていないため、糖脂質含量の規格化にはいたっていない。そこで暫定的にリムルス法によって糖脂質含量を定め、微生物、重金属、砒素等の規格は一般食品に準じることとした。

・糖脂質 activity	1mg/mg 以上
・外観、形状	僅かに淡黄色
・重金属	20 ppm 以下
・ヒ素	2 ppm 以下
・一般生菌数	3000個/g 以下
・大腸菌群	陰性
・カビ、酵母	300個/g 以下
・水分	8.5% 以下

2－3　米糠発酵抽出物の品質管理技術の確立

２１年度は、米糠発酵抽出物中の有効成分である糖脂質を、特異的に測定する品質管理技術の確立をめざし。必要な抗体の取得を行なった。

2－3－①　有効成分糖脂質に対する特異的モノクローナル抗体の取得

（研究目的）
米糠発酵抽出物中の有効成分となるIP-Xを特異的に測定するELISA法に必要な抗体を取得する。

（研究内容）
２－１－②で精製したIP-Xをマウスに免疫し、IP-Xに対する抗体価が十分に高まったところで、マウスの脾臓を摘出し、B-cellミエローマ細胞と融合させせることで、モノクローナル抗体を得る。

（研究成果）
①動物、細胞
・BALB/cマウス（6週齢、雄性）：日本クレアより購入し、一週間以上、飼育した後に実験に供した。
・ミエローマ：P3-X63-Ag8-U1(P3U1)

②試薬
・固相化抗原：IP-X純度90%以上（本プロジェクトで精製した標品）
・Dulbecco's Phosphate Bufferd Saline (Sigma)
・２次抗体：アルカリフォスファターゼ標識免疫グロブリン：
Anti-MousePolyvalentImmunoglobulins (IgG.A.M) AlkalinePhoshataseConjugate Antibody developed in Goat（SIGMA）
・発色基質：p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム 六水和物（ナカライ）
・Albumin,Fraktion V：BSA(BOEHR INGER MANNHEIM)
・血液凝固阻止剤日本薬局方ヘパリンナトリウム注射液 腸粘膜
・ノボ・ヘパリン 注1000（アンベティス ファーム株式会社）
・RPMI 1640(SIGMA)
・Hypoxanthine (Wako)、
・Thymidine (Wako)、
・Aminopterin (Wako)、
・BMコンディムドH1（ロシュ）
・PEG 1000 (Wako)；ポリエチレングルコール1000 一級
・ADJUVANT COMPLETE FREUND (Difco)
・Silver Stain II Kit (Wako)
・2% ECLTM Advance blocking agent (GE Healthcare)
・polyvinylidenefluoride, Immuno blot PVDF membrane (BIO-RAD)
・Tween 20 (Wako)
・Nitrobluetetrazolium (Wako)
・5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate disodium salt 1.5-Hydrate (Wako)
・Glycine (Wako)
・Methanol (Wako)
・Tris(hydroxymethyl)aminomethane (ナカライテスク)
・塩酸 (ナカライテスク)
・Glycerol (Wako)

・ジメチルフォルムアミド (ナカライテスク)
・TritonX-100 (ナカライテスク)・ブロモフェノールブルー (Wako)
・2-mercapto ethanol (Wako)
・Sodium Dodecyl Sulfate (ナカライテスク)
・Tricine (AppliChem)
・Fetal Calf Serum (HyClone)

③器具・装置
・96 穴イムノプレート：Immunoplate maxisorb （NUNC）
・装置遠心機：CR100（トミー）
・プレートリーダー： Model 550 （BIO-RAD）
・乾式インキュベーター（SANYO）
・セミドライブロッティング装置 (TAITEC)
・電気泳動装置 (ATTO)
・ガラスキャピラリー (ClayAdams)
・振盪培養器　Bioshaker BR-21UM(TAITEC)
・プレートミキサー SHAKING MIXER (IWAKI)
・電子天秤 GR-200 (AND)
・カウンティングチェンバー (HIRSCHMANN)
・スライドガラス (MATSUNAMI)
・CHROMATOGRAPHY PAPER 3MM CHR (WHATMAN)

④免疫法
免疫法は、Brade ら(1)の報告を参考として、精製 IP-X（20μg/ml）を 500μl 腹腔内投与することにより行った。初回免疫のみ IP-X と ADJUVANT COMPLETE FREUND（Difco）を等量混和した溶液（IP-X 終濃度：20μg/ml）を 500μl 皮下投与した。初回免疫後、2 週間間隔で追加免疫を行った。2 回目の免疫以降、毎回 IP-X 投与前にヘパリン処理したガラスキャピラリーを使って眼底採血を行い、各マウスから 50μL/匹程度ずつ血液を採った。血液を遠心分離して血漿を回収し、IP-X に対する抗体価を後述の ELISA 法により測定した。

⑤抗体価測定のための ELISA 法
IP-X に対する抗体価の測定法として、谷口ら(2)の方法を参考に IP-X を固相化抗原として用いる ELISA 法を用いた。固相化抗原として精製 IP-X を使用した。PBS（Sigma）で希釈した IP-X（10μｇ/ｍl）を 50μL/well の割合で 96 穴イムノプレート（NUNC-IMMUNO PLATE MAXISORP）に加えサランラップで表面を覆い 4℃で一晩固相化した。固相化後、抗原溶液はデカンテーションにより捨て、４%BSA 添加 PBS 溶液（以下 4%BSA-PBS 溶液と略す）を 200μL/well の割合で加え１時間ブロッキングを行った。その後、デカンテーションによって液を捨て、0.05%Tween20 含有生理食塩水（以下 TBS-t と略す）により（200μL/well）3 回洗浄した。

抗原投与後 7 日目に眼底採血により各マウスから 50μL 程度の血液を採取し、それより、分離した血清を４%BSA-PBS にて段階希釈した液を加え 37℃で１時間反応させた。この時、同時にノーマルの BALB/c マウスより得た血清を陰性対照として試験した。反応後、T-saline により 3 回洗浄した。二次抗体としてアルカリフォスファターゼ標識抗マウス IgG.A.M ヤギ免疫グロブリンを４%BSA-PBS 溶液にて 1000 倍希釈したものを 50μL/well の割合で加え 37℃で１時間反応させた。その後、T-saline にて 5 回洗浄した。1mM 塩化マグネシウム含有 0.1M 炭酸ナトリウム緩衝液に発色基質の p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム(p-NPP)(1mg/mL)を溶解した液を 200μL/well の割合で加え、室温で 40 分間反応させた後、415ｎｍの吸光度をプレートリーダー（BIO-RAD：model-550）にて測定し、抗体価を求めた。

⑥Western Blotting による血漿中に存在する抗体の確認
Tricine-SDS PAGE は H. Schagger により開発された変法に従った(3)。5%の濃縮ゲルによって試料を濃縮し、続いて 15%分離ゲルで分離させた。試料に緩衝液（137.5mM Tris-HCl，4% SDS，10% 2-ME，0.0095% Bromo phenol blue，14% Glycerol)を入れ、95℃で 5 分間熱処理した。これを 20mA で 90 分間電気泳動した。ゲルは二枚作製し、一枚は Tricine-SDS PAGE　で試料を分離した後、ゲルを添付のプロトコールに従い、Silver Stain II Kit（Wako）を用いて銀染色を行った。もう一方のゲルは電気泳動後、ウエスタン緩衝液（25mM Tris，192mM Glycine，20%methanol）に 30 分間浸漬した。あらかじめウエスタン緩衝液に浸漬しておいた濾紙 2 枚および PVDF フィルター（polyvinylidenefluoride，Immuno blot PVDF membrane，BIO-RAD）をブロッティング装置（セミドライブロッティング，TAITEC）のマイナス側から濾紙、ゲル、フィルター、濾紙の順に並べ、ブロッティング装置でブロッティングした（108V，1.5 時間)。フィルターを 2% ECLTM Advance blocking agent（GE Healthcare）を含む TBS（Tris Buffered Saline，150mM NaCl，20mM Tris（pH7.5)）溶液でブロッキングし、0.05% Tween20（Wako)、0.2% TritonX-100（ナカライテスク)を含む TBS-TT で洗浄した。１次抗体溶液として血清を４％ BSA-PBS にて段階希釈した液を加え 37℃で１時間反応させた後、TBS-TT で洗浄し、2 次抗体溶液 Anti-MousePolyvalentImmunoglobulins（IgG.A.M）Alkaline Phoshatase Conjugate Antibody developed in Goat（SIGMA）をブロッキング緩衝液で 1000 倍に希釈）を反応(37℃、1 時間)させた。反応後、発色緩衝液（0.033% Nitrobluetetrazolium，Wako 0.021% 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate disodium salt 1.5-Hydrate，Wako）をアルカリフォスフォターゼ緩衝液に溶解させた）を 5ml 加え、37℃で 2 時間発色させた。

⑦ハイブリドーマ取得のための細胞融合
本田らの論文(4)に記載されているポリエチレングルコール法により細胞融合を行った。

⑧ミエローマの培養
ミエローマは、細胞融合の一週間前に液体窒素保存してあるものを戻した。培養液に FCS(10%)、アンピシリン（60μg/ml)、カナマイシン（50μg/ml）を含有する RPMI1640 培地を用いた。

⑨スクリーニング法
ハイブリドーマは HAT 培地により選択した。細胞融合した細胞の入った 96 穴プレートを 37℃の 5%CO_2 インキュベーター内で３日間培養し、4 日目に、各 well についてコロニーの有無を確認した。

＜一次スクリーニング＞
10 日目に、培養上清 50μL を各 well より回収し、IP-X を固相化したプレートを用いた ELISA により、発色が認められる well、すなわち、IP-X に対する抗体産生を行っているハイブリドーマが存在する well を選択した。この時、陰性対照としては、ハイブリドーマを培養している培地を用いた。陽性対照として、IP-X に対して ELISA で抗体が認められた抗血清を培地にて 50 倍希釈したものを同時にアッセイした。

＜ニ次スクリーニング＞
ELISA により抗体産生が認められた well の細胞を懸濁し、別の 96well プレートに半量を移し、それぞれに新鮮な培養液を加えた。各細胞は増殖にあわせて 4well まで拡大培養し、その時点で、各細胞について 200μL の培養上清を回収し、IP-X を固相化抗原として用いて ELISA を行った。

（２）結果

①免疫

4 匹のマウスの血清における抗体価の推移を図 1 に示す。IP-X（10μg/mL、50μg/mL）を固相化したプレートを用い、2 回目（免疫開始から 2 週間後）の抗原投与前に、採血した血液から分離した血漿を PBS 溶液により 200 倍希釈して ELISA 法により抗体価を測定した。図中の縦軸は吸光度、横軸は経過日数を示す。色はマウスの個体識別を示す。

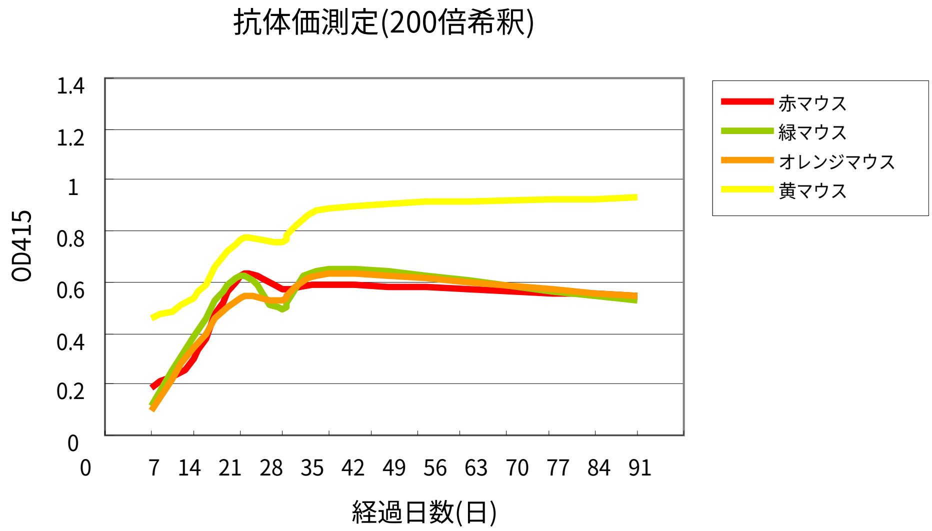


図 1

②Western Blotting による血漿中に存在する抗体の確認

IP-X を Tricine-SDSPAGE に供し、各マウスの抗血清を使って Western Blotting を行なった(図２)。図の左端は銀染色の結果。右 4 列は Western Blotting。色はマウスの個体識別を示す。

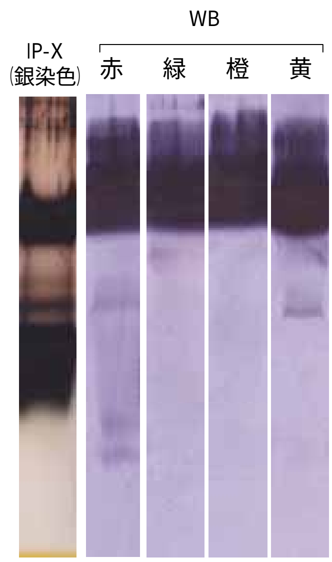


図 2

（３）まとめ
IP-X の糖鎖に結合する抗体を産生するハイブリドーマを５種スクリーニングした。

※参考文献

1. Brade, L., O. Holst, P. Kosma, Y. X. Zhang, H. Paulsen, R. Krausse, and H. Brade. 1990. Characterization of murine monoclonal and murine, rabbit, and human polyclonal antibodies against chlamydial lipopolysaccharide. *Infect Immun 58:205*.
2. Taniguchi, Y., T. Nishizawa, T. Honda, N. Yoshioka, H. Inagawa, C. Kohchi, and G. Soma. 2007. Development and potential use of a monoclonal antibody to the lipopolysaccharide of *Pantoea agglomerans* (IP-PA1). *Anticancer Res 27:3701*.
3. Schagger, H. 2006. Tricine-SDS-PAGE. *Nat Protoc 1:16*.
4. Honda, T., H. Inagawa, M. Fukushima, A. Moriyama, and G. Soma. 2002. Development and characterization of a monoclonal antibody with cross-reactivity towards uracil and thymine, and its potential use in screening patients treated with 5-fluorouracil for possible risks. *Clin Chim Acta 322:59*.

2－3－② 当該モノクローナル抗体を用いた ELISA 法の確立

（研究目的）
米糠発酵抽出物中の有効成分となる IP-X を特異的に測定する ELISA 法を確立し､IP-X を 1ng/g 以上の感度で検出できるようにする。

（研究内容）
取得予定のモノクローナル抗体を 2 種を組み合わせることで、その抗体が認識する糖脂質を定量的に測定できるサンドイッチ型 ELISA（Enzyme linked immuno solvent assay）法を構築する

（研究成果）
取得予定の IP-X の糖鎖に結合するモノクローナル抗体を使い、IP-X を定量的に測定できる ELISA 法を構築する予定であるが、抗体のアイソタイピングの確認などが必要であり、今期中の確立には至らなかった。認定申請書の計画に記載の通り、次年度にかけて確立をめざす。

第3章　全体総括

本事業は、川中の発酵企業に発酵製品の高付加価値化と多様化の道を開き、川下のヘルス産業メーカーに発酵素材を使った高付加価値商品を提供することを目的とし、免疫賦活作用を有する高付加価値の発酵素材の開発を達成することを最終目標とした、３年間の特定研究開発計画の一環の位置づけで推進されたものである。

２１年度においては、下記の内容の研究開発を行なった。
①食用植物より､免疫活性化に特長のある糖脂質を持つグラム陰性細菌をスクリーニングする。
②本グラム陰性菌より１種選び、農産廃棄物である米糠を発酵基質として、免疫活性化能を持つ、高付加価値化発酵食品素材（本件は「米糠発酵抽出物」とよぶ）の製造法を確立する。
③米糠発酵抽出物中の有効成分である糖脂質を、特異的に測定する品質管理技術を確立する。

①では､少なくとも２０種類のグラム陰性細菌をスクリーニングしてライブラリー化し､うち、免疫賦活作用を有する発酵素材としての米糠発酵抽出物の製造に適した１種類の菌を選択し、この菌の有する糖脂質について解析することを目標とした。本事業においては、９１種類のグラム陰性細菌を単離し、うち２８株の菌については同定しライブラリー化することができた。さらに、この中から、米糠発酵抽出物製造に使用するとした稲パントエア菌 X 株について、基本的な生物活性と構造の特徴を分析した。

②では、選択したグラム陰性細菌（稲パントエア菌 X 株）と米糠を使って、30L のパイロットスケールでの米糠発酵抽出物の製造法を検討し、予備的に規格を決定することを目標とした。本事業においては、ライブラリーの中より、米糠での生育に適したパントエア X 株を選択し、米糠を使って､5L 及び 30L ジャーファメンターでの培養に成功した｡得られた試作品を用いて、規格の予備的決定まで行なうことができた。ただし、有効成分である IP-X の測定と規格については、前提的に一般糖脂質測定法によって暫定的に決定しており、最終的には、ELISA 法の確立を待って決定することとなる。

③では、米糠発酵抽出物の有効成分である IP-X を他の糖脂質と区別して特異的に測定する ELISA 法に必要なモノクローナル抗体を６種とり、それらの抗体を使って ELISA 法を確立することを目標とした。本事業においては、当該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを５種スクリーニングした。このうち、現在安定的にモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選別しつつある。これらの性格決定を行なった後 ELISA 法の確立をめざす。

以上の結果より、今年度の事業における目標はほぼ達成できたと考える。すなわち、３年間の特定研究開発計画に則り、本事業により、米糠発酵抽出物製造の基本が確立できた。